

Die Übertragung von
Trypanosoma evansi (Stamm Bali)
auf das embryonierete Hühnerei
und auf Küken

BARBARA DIERIG

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie des Fachbereiches Tiermedizin
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. J. Boch

Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. H. K. Dennig

Die Übertragung von
Trypanosoma evansi (Stamm Bali)
auf das embryonierte Hühnerei
und auf Küken

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
BARBARA DIERIG
aus
Osnabrück

München 1979



Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich

Referent: Prof. Dr. H. K. Dennig

1. Korreferent: Prof. Dr. H. G. Buschmann

2. Korreferent: Prof. Dr. I. Gylstorff

Tag der Promotion: 23. Februar 1979

Meinem Ur-Urgroßvater Professor
Dr. Carl von Cupffer gewidmet.

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
I. Einleitung	1
II. Die Übertragung von Trypanosoma evansi auf das embryonierte Hühnerei und auf Küken (anhand der Literatur)	2
III. Eigene Untersuchungen	11
A. Material und Methoden	11
B. Ergebnisse	16
1. Vergleich der Dottersack- mit der Chorio-Allantois-Membran-Übertragung (CAM)	16
2. Passagierung von T.evansi im embryonierten Ei	16
3. Verlauf der Parasitämie im Hühnerembryo	18
4. Übertragung von T.evansi auf unterschied- lich lang bebrütete Eier	18
5. Prüfung des Virulenzverhaltens von T.evansi während der Eipassagen	25
6. Morphologisches Verhalten von T.evansi im Laufe der Eipassagen	25
7. Bestimmung der zur Infektion von Hühner- embryonen notwendigen Erregerzahl	26
8. Die T.evansi-Infektion im Küken	27
9. Überlebenszeit von T.evansi im unbebrü- ten Hühnerei	28
IV. Besprechung der Ergebnisse	30
V. Zusammenfassung	42
VI. Literaturverzeichnis	44

Lebenslauf

I. EINLEITUNG

Trypanosoma evansi verursacht bei Säugtieren, besonders bei Haustieren, die unter dem Begriff "Surra" bekannte Krankheit. Im Gegensatz zu den meisten Trypanosomen, die zyklisch übertragen werden, erfolgt die Übertragung von *T.evansi* auf mechanische Weise. Als Überträger kommen vorwiegend Tabaniden in Frage.

Beim Geflügel oder Wildvögeln wurde unter natürlichen Verhältnissen noch keine *T.evansi*-Infektion beobachtet. Unter experimentellen Bedingungen gelang in Einzelfällen die Übertragung auf Geflügel. Auch die Anzucht auf embryonierten Hühnereiern war möglich, jedoch fehlten bislang systematische Untersuchungen über das Verhalten des Erregers im Hühnerembryo und im Geflügel.

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob *T.evansi* kontinuierlich auf dem embryonierten Hühnerei gezüchtet und passagiert werden kann. Weiterhin war zu untersuchen, ob im Laufe der Passagierung eine Veränderung hinsichtlich der Virulenz oder Morphologie eintritt. Übertragungsversuche auf Küken sollten klären, ob unter Umständen Hühner als Infektionsträger in Frage kommen.

II. DIE ÜBERTRAGUNG VON TRYPANOSOMA EVANSI AUF DAS EMBRYO- NIERTE HÜHNEREI UND AUF KÜKEN (anhand der Literatur)

Bis zur Jahrhundertwende war die Meinung vorherrschend, daß Geflügel säugetierpathogenen Trypanosomen-Infektionen gegenüber resistent sei. Die Versuche von SCHILLING (1904) zeigten jedoch, daß Vögel unter bestimmten Voraussetzungen für diese Trypanosomen-Infektionen empfänglich sein können. SCHILLING übertrug erstmals *T.brucei* erfolgreich auf Gänse, wobei es ihm möglich war, den Parasiten über 2 Passagen hinweg auf einzelnen Versuchstieren zu halten. Die längste Infektionsdauer betrug 136 Tage. Obwohl bei einigen Gänsen im Laufe dieser Zeit vereinzelt Trypanosomen mikroskopisch nachgewiesen werden konnten, war bei der Mehrzahl der Tiere die Anwesenheit der Parasiten erst durch den Rückübertragungsversuch auf Ratten festzustellen. Dabei zeigte es sich, daß die Trypanosomen auch nach der Passage in Gänsen die volle Pathogenität für Ratten behielten.

GOEBEL (1906, 1908) übertrug *T.brucei* auf Hühner. Da er vermutete, daß die höhere Körpertemperatur des Geflügels die Resistenz gegenüber Trypanosomen verstärkte, injizierte er die Parasiten in Kamm und Hautlappen, das heißt in Körperstellen mit niedriger Temperatur. Auf diese Weise erzielte er bessere Ergebnisse als mit der intraperitonealen Übertragung. Bei der Mehrzahl der Hühner verlief die Infektion positiv, wobei Parasiten bis zu 55 Tagen p.i. nachweisbar waren. Allerdings war der Erregernachweis nur durch Rückübertragungen auf Meer-schweinchen möglich.

MESNIL und BLANCHARD (1912) untersuchten das Verhalten von *T.rhodesiense* und *T.gambiense* in Hühnern, die fast immer empfänglich für beide Parasitenarten waren. Die mit *T.gambiense* infizierten Tiere verendeten bis zu 75 Tagen, die mit *T.rhodesiense* infizierten Tiere bis zu 72 Tagen p.i.. Während der gesamten Infektionsperiode war bei keinem der Versuchstiere ein Nachweis

im Blutausstrich möglich. Die Parasiten wurden entweder bei regelmäßiger Untersuchung im Leukozytensaum zentrifugierter Blutproben oder in Rückübertragungsversuchen nachgewiesen. Im Laufe der Infektionsdauer zeigten die Tiere die Symptome einer Iridocyclo-keratitis, wobei die Parasiten auch im Augenkammerwasser festzustellen waren.

MESNIL, LEGER und PERARD nahmen 1936 ihre Versuche mit *T. rhodesiense* und *T. gambiense* wieder auf, ohne daß es ihnen diesmal möglich war, Hühner mit diesen Trypanosomen zu infizieren.

HALLAUER und KUHN (1940) verwendeten bei Übertragungsversuchen mit Trypanosomen erstmals Hühnerembryonen. Sie übertrugen dabei *T. brucei* auf die CAM 9-12 Tage lang bebrüteter Eier. Die Parasiten traten erstmals 2-3 Tage p.i. im peripheren Blut auf und vermehrten sich bis zum 4. Tag deutlich. Am 5. Tag verendeten die Embryonen mit starker Parasitämie. Wurde die Parasitenübertragung am 18.-20. Bebrütungstag vorgenommen, so schlüpften die Küken und verendeten im allgemeinen 1-2 Tage p.n.. Neben Einzelübertragungen führten die Verfasser auch Passagen auf embryonierten Eiern durch. Im Laufe von 22 Passagen wurde dabei keine Virulenzveränderung gegenüber dem Embryo beobachtet. Die Infektion 10 Tage alter Küken verlief tödlich, während 21 Tage alte Tiere bei vorübergehender Somnolenz und Ataxie überlebten. Ausgewachsene Hühner erwiesen sich als nicht empfänglich.

Morphologische Veränderungen der Trypanosomen traten nach der 10.-12. Eipassage auf. Hierbei wurden 2 Formtypen festgestellt. Neben normalen, schlanken Trypanosomen traten zahlreiche plumpe, aufgelockerte Formen mit starker Vakuolenbildung auf, die bei weiteren Passagen wieder verschwanden. Die ursprüngliche Pathogenität der Trypanosomen für Mäuse und Meerschweinchen wurde durch die Passagen nicht verändert.

FAGARD, CHARDOME und PEEL (1962) infizierten 11 Tage lang bebrütete Eier mit *T.brucei*. Die Mehrzahl der Embryonen verendete vor dem Schlupf. Ein Küken schlüpfte und überlebte 8 Tage lang. Das Blut des Tieres war während der postnatalen Phase parasitenhaltig. Von diesem Küken ausgehend wurden zwei weitere Passagen mit Erfolg durchgeführt. Übertragungsversuche auf ausgewachsene Hühner verliefen negativ.

BIENZ (1967) übertrug *T.brucei* auf Nährböden und embryonierete Hühnereier. In beiden Medien entwickelten sich Parasitenformen, die denen im Vektor entsprachen. In embryonierten Eiern waren die Trypanosomen ausschließlich in der Allantoisflüssigkeit nachweisbar. Auch bei der anschließenden dreimaligen Passagierung der Erreger fand die Vermehrung nur in der Allantoisflüssigkeit statt.

OTIENO und SARGEAUNT (1971) beschäftigten sich mit der Morphologie von *T.brucei* im Hühnerembryo bei verschiedenen Temperaturen. Die Eier wurden bei 37° C bebrütet, wobei sich bei 37° C nur eine geringgradige Parasitämie ausbildete. Einige Küken überlebten die Infektion und schlüpften. Bei 39° C wurde eine wesentlich stärkere Vermehrung der Trypanosomen beobachtet, die den Tod der Embryonen verursachte. In den bei 39° C bebrüteten Eiern stellten die Autoren zahlreiche Trypanosomen fest, die von der normalen Erscheinungsform abwichen. Während der Zeit vom 7.-9. Tag p.i. traten vorwiegend vielkernige Parasitenformen auf, die nach diesem Zeitpunkt wieder verschwanden. Danach wurden zahlreiche stumpfe, vakuolenreiche und runde Formen mit Kinetoplast und deutlichem Kern beobachtet. Außerdem wurden zahlreiche granulahlaltige Degenerationsformen nachgewiesen.

MITCHELL und Mitarb. (1939) prüften das Verhalten von *T.equiperdum* im Hühnerembryo, wobei der Parasit auf 16 Tage lang bebrütete Eier überimpft wurde. Einige Embryonen verendeten, ohne daß

die Todesursache untersucht wurde, auch führten die Autoren keine Kontrolle des Infektionsverlaufes im Embryo durch. Die geschlüpften Küken waren klinisch gesund, das Blut war mikroskopisch frei von Trypanosomen. Bei einigen Küken traten 3 Tage p.n. Parasiten im peripheren Blut auf. Alle Tiere, die eine Parasitämie zeigten, verendeten 5 Tage nach dem Schlupf. In der Allantoishöhle waren Trypanosomen mit Sicherheit nicht zu diagnostizieren, trotzdem führte die Allantoisflüssigkeit nach der Übertragung auf Ratten zur T.equiperdum-Infektion.

ALTURE-WERBER (1948) untersuchte das Verhalten von T.equiperdum im Dottersack von Hühnerembryonen. Vom 4.-6. Tag p.i. entwickelte sich eine starke Parasitämie, die sich bis zum 9. Tag wieder abschwächte. Der Tod der Embryonen trat 9-11 Tage p.i. ein.

Quantitative Untersuchungen zeigten, daß 2 000 000 - 500 000 Erregern bei 93 % der Embryonen zu einer Parasitämie führten. Inokula mit weniger als 150 000 Erregern ergaben keine Infektion.

KAWECKI und MORZYCKI (1953) übertrugen T.equiperdum auf embryonierte Hühnereier verschiedenen Alters. Bei 7-11 Tage alten Embryonen entwickelte sich ein Parasitenbefall, der seinen Höhepunkt 8-9 Tage p.i. hatte und bei der Mehrzahl der Eier zum Absterben führte. Bei der Übertragung auf 19 Tage alte Embryonen kam es zu keiner Parasitenvermehrung. Darüberhinaus stellten die Autoren fest, daß Inokula von 20 000 - 2 000 000 Erregern für die Übertragung auf Embryonen ausreichten.

NAKABYASHI und MOTOMURA (1966) infizierten embryonierte Hühnereier mit T.gambiense. Die starke Vermehrung der Parasiten führte durchschnittlich nach 7 Tagen zum Tode der Embryonen.

Den Autoren gelang die Passagierung von *T.gambiense* 11 mal, eine weitere Übertragung war danach nicht mehr möglich. Während der Passagierung veränderte der Erreger seine Pathogenität für Mäuse nicht.

CHABAUD (1939) übertrug *T.brucei*, *T.equinum* und *T.rhodesiense* auf 8-10 Tage alte Hühnerembryonen. Alle 3 Arten wurden über 15 Passagen auf dem Ei gehalten. 3-4 Tage p.i. traten die ersten Parasiten im peripheren Blut auf, vermehrten sich stark bis zum 8. Tag und verschwanden 9 Tage p.i.. Die Embryonen verendeten 9-11 Tage p.i.. Während der Eipassagen stellte der Autor keine morphologischen Veränderungen fest. Im Gegensatz zu den erwähnten Trypanosomenarten war *T.lewesi* auf dem embryonierten Hühnerei nicht zu kultivieren.

OAG (1940) versuchte *T.brucei*, *T.equiperdum* und *T.congolense* im bebrüteten Hühnerei anzuzüchten. Er verwendete 12 Tage alte Embryonen. 5 Tage p.i. waren bei den mit *T.brucei* infizierten Eiern Parasiten zu finden, eine Weiterpassagierung war jedoch nicht möglich. *T.equiperdum* und *T.congolense* konnten nicht angezüchtet werden.

HOOD (1949) untersuchte den Infektionsverlauf von *T.brucei*, *T.equiperdum* und *T.hippicum* im embryonierten Hühnerei. Dabei führte die Autorin auch einen Vergleich der gebräuchlichen Beimpfungsmethoden durch. Außer einer verkürzten Präpatenzzeit bei der Dottersackinoculation stellte sie keine signifikanten Unterschiede im Infektionsverlauf fest. Bei allen Trypanosomenarten traten am 4.-6. Tag p.i. die ersten Erreger im peripheren Blut auf und nahmen bis zum 7.-9. Tag stark zu. Die Mehrzahl der Embryonen verendete 9-11 Tage nach der Infektion.

Bei ausnahmsweise geschlüpften Küken persistierte der Dottersack bis zu 48 Stunden. Alle Küken wiesen Erreger im peripheren Blut auf, die bei der Mehrzahl der Tiere 2 Tage p.n. verschwanden. Sie verendeten 6 Tage nach dem Schlupf mit Symptomen wie Ataxie, Freß- und Trinkunlust. Nur in einem einzigen Fall überlebte ein mit *T.equiperdum* infiziertes Küken mit massiver Parasitämie. Nach 6 Tagen konnten jedoch Trypanosomen nicht mehr festgestellt werden. Ebenso waren die klinischen Erscheinungen verschwunden. Weitere Untersuchungen des Kükens wurden nicht durchgeführt. Neben embryonierten Eiern infizierte die Autorin auch 2-3 Tage alte Küken. Nur bei einem einzigen Küken wurden 12 Wochen p.i. Trypanosomen durch einen Rückübertragungsversuch auf Mäuse nachgewiesen.

GOEDBLOED und WILSON (1967) und GOEDBLOED und KINYANJUI (1970) befassten sich mit *T.brucei*, *T.rhodesiense*, *T.congolense* und *T.vivax* im Hühnerembryo. Dabei zeigte sich, daß *T.brucei* und *T.rhodesiense* in 7-9 Tage alten embryonierten Eiern anzüchtbar waren. Nach 4-6 Tagen setzte eine Vermehrung der Parasiten ein, danach verendeten die Embryonen.

Eine siebenmalige Passage von *T.brucei* beziehungsweise eine viermalige Passage von *T.rhodesiense* wurde erfolgreich durchgeführt. Veränderungen hinsichtlich der Morphologie und der Virulenz konnten nicht beobachtet werden.

Bei *T.congolense* und *T.vivax* fand keine Vermehrung statt und eine Passagierung war nicht durchzuführen.

GANAPATI (1948) übertrug metazyklische und trypomastigote Formen von *T.cruzi* auf Hühnerembryonen. Dabei verwendete er 13-14 Tage alte Eier. Nach dem 3. Tag p.i. waren an der

CAM Laisionen festzustellen, in denen eine intrazelluläre Vermehrung nachgewiesen werden konnte. Dabei waren die Stadien des vertebraten Wirtes zu beobachten. 5 Tage p.i. traten daneben auch Crithidiaformen auf.

PIPKIN fasste 1960 die bis dahin vorhandene Literatur über das Verhalten von verschiedenen Hämoflagellaten im Hühnerembryo und in Kulturmedien in einer ausführlichen Arbeit zusammen.

In eigenen Versuchen mit *T.cruzi* infizierte er embryonierte Eier und bebrütete sie bei 28° C. Nach 6-7 Tagen waren Leptomonasformen nachzuweisen. Zu diesem Zeitpunkt waren die Embryonenschen abgestorben. Durch histologische Schnitte wurde eine intrazelluläre Vermehrung auf der CAM beobachtet, während ein Befall des Blutes nicht nachgewiesen werden konnte. Trotz einzelner erfolgreicher Übertragungen von Ei zu Ei war eine kontinuierliche Passage nicht möglich.

MELLO und DEANE (1975) züchteten *T.cruzi* im Hühnerembryo bei verschiedenen Temperaturen. Die besten Ergebnisse wurden bei einer Temperatur von 33°-34° C erreicht. Es entwickelten sich sowohl die Trypanosomenstadien des Endwirts als auch Überträgerformen. Bei 37°-39° C bildeten sich ausschließlich die Formen des Endwirts, die vorwiegend auf der CAM zu finden waren.

OBERLIN und ANSARI (1951) untersuchten den Temperatureinfluß auf die Entwicklung von *Leishmania tropica* im Hühnerembryo. Sie wiesen nach, daß bei 25° C eine Kultur nicht möglich war, da die Embryonen an Unterkühlung verendeten. Allerdings wurden 3 Tage nach deren Tod noch Leptomonasformen beobachtet. Bei 31° C-35° C war eine gute Vermehrung der Leptomonasformen festzustellen, während bei 38°-40° C Leishmanien nicht

mehr auftraten. Die Autoren stellten außerdem fest, daß sich diese Formen auch im unbebrüteten Ei über 3 Tage hin vermehren.

HOLBROOK und STAUBER (1972) untersuchten das Verhalten von *Leishmania donovani*, wobei eine Züchtung der Parasiten im Hühnerembryo nicht möglich war.

Über das Verhalten von *T.evansi* im embryonierten Hühnerei und im Geflügel liegen nur wenige Berichte vor.

Im Rahmen ihrer Untersuchungen über säugetierpathogene Trypanosomenarten im Geflügel, infizierten MESNIL und MARTIN (1912) Gänse mit *T.evansi*. Während sich nach Übertragung von *T.brucei* bei dieser Tierart regelmäßig eine latente Infektion entwickelte, wurde *T.evansi* nur ein einziges Mal in der Gans zur Vermehrung gebracht. Die Trypanosomen waren 12 Tage lang mit Hilfe von Rückübertragungsversuchen auf Meerschweinchen nachzuweisen.

LONGLEY und Mitarbeiter (1939) gelang es erstmals *T.evansi* im embryonierten Hühnerei anzuzüchten und über 3 Passagen zu halten. Die Pathogenität für die Ratte veränderte sich im Laufe der Eipassagen nicht.

Die umfassendste Arbeit auf diesem Gebiet veröffentlichten VAN DEN BERGHE (1943) und RODHAIN und VAN DEN BERGHE (1943). VAN DEN BERGHE übertrug *T.evansi* auf bebrütete Hühnereier und stellte fest, daß 8 - 14 Tage alte Embryonen besonders hoch empfänglich sind. Es entwickelte sich eine Parasitämie, die den Tod der meisten Embryonen 9 Tage p.i. zur Folge hatte. Aus 200 infizierten Eiern schlüpften 6 Küken, alle anderen verendeten vor dem Schlupf. Bei 3 Küken wurden zum Zeit-

punkt des Schlupfes Parasiten im peripheren Blut nachgewiesen. Diese verschwanden durchschnittlich 6 Tage p.n.. Ab dem 5. Tag p.n. traten Degenerationsformen auf. Eine Übertragung ab dem 16. Bebrütungstag verlief immer negativ. Küken und ausgewachsene Hühner verhielten sich der Infektion gegenüber resistent.

ALWAR und RAMANUJACHARI (1953) übertrugen T.evansi auf 15 Tage alte Hühnerembryonen. Die Autoren wählten den späten Zeitpunkt um Küken zu erhalten, die erst nach dem Schlupf eine Trypanosomen-Infektion entwickelten. Trotzdem verendeten ca. 40 % der Embryonen vor dem Schlupf, der restliche Teil schlüpfte. Bei den Küken bestand zu diesem Zeitpunkt eine geringgradige Parasitämie. Bei einigen Küken bestand eine latente Infektion, die maximal bis 27 Tage p.n. nachweisbar war. Den Autoren gelang außerdem eine Küken- zu Kükenübertragung.

MISRA und CHOUDHURY (1975 und 1976) infizierten einige Küken mit T.evansi. Es entwickelte sich eine schwache Parasitämie, die durchschnittlich 12 Tage p.i. verschwunden war. Morphologische Untersuchungen ergaben, daß die Trypanosomen aus dem Küken mit $24,45\text{ }\mu\text{m}$ kleiner waren, als die $30,02\text{ }\mu\text{m}$ langen Parasiten im Rattenblut, das als Inokulum verwendet wurde.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Material und Methoden

Der verwendete Trypanosoma evansi-Stamm (Bali) wurde 1975 von DENNIG auf Bali/Indonesien aus dem Blut eines Rindes isoliert. Seit dieser Zeit wird der Stamm im Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Universität München auf verschiedenen Tierarten - Mäuse, Ratten, Hamster, Meerschweinchen, Kaninchen, Schweinen und Ziegen - passagiert, um eine einseitige Adaptation an einem Wirt zu verhindern.

Die für die Versuche verwendeten Eier wurden von der Firma "Bayrische LSL-Vermehrung" geliefert. Es handelte sich um 3 - 7 Tage alte Bruteier von weißen Leghorn-Hennen.

Die Bebrütung erfolgte in einem Brutschrank ("Ehret") bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70 % und zweimaligem täglichem Wenden.

Infektionsversuche wurden an frisch geschlüpften Küken aus eigener Zucht vorgenommen.

Die Haltung erfolgte in Kükenkäfigen der Firma "Ebeco" bei einer Raumtemperatur von 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40 - 50 % unter Zusatz einer Rotlichtlampe. Die Küken wurden mit Aufzuchtfutter (Alleinkorn K, Feldmochinger Kraftfuttermühle) ernährt. Wasser und Futter wurden ad libidum verabreicht.

Zur bakteriellen Infektionsprophylaxe wurde den Küken 4 Tage lang Chloramphenicol im Trinkwasser zugesetzt. (Dosierung: 1 g H₂O lösliches Pulver in 1 l Wasser.)

Die bebrüteten Eier wurden mit der "Universal Quarzschierlampe der Firma Blohm" kontrolliert. Die Versuche mit unbebrüteten Eiern erfolgten in frischen Eiern aus dem Handel.

Die Mäuseversuche wurden an ca. 30 g schweren weiblichen Mäusen (NMRI-Stamm Hann.) aus institutseigener Zucht durchgeführt. Während der Experimente wurden die Mäuse unter einheitlichen, gleichbleibenden Bedingungen bei einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40 - 50 % in Makrolonkäfigen gehalten. Als Futter erhielten die Tiere "atronin-Mäusediät" (Firma Altrotge, Lage/Lippe) und Wasser ad libidum.

Inokula:

Als Inokula für die 1. Eipassage und für Übertragungsversuche von Maus und Küken wurde stark parasitenhaltiges Mäuseblut (Herzpunktion) verwendet, das mit PBS + Antibiotika (Dos: 100 i.E. Penicillin-Streptomycin auf 1 ml Lsg.) 1:1 verdünnt. Die Inokulationsmenge betrug für das Ei 0,1 - 0,15 ml, Küken wurde 0,2 - 0,3 ml i.p. verabreicht.

Als Inokulum für Eipassagen wurde stark parasitenhaltiges Blut von 15 - 17 Tage alten Hühnerembryonen verwendet. Zur Kontrolle des Infektionsgrades des Embryos wurde der stumpfe Eipol unter sterilen Kautelen geöffnet und ein Tropfen Blut aus einem oberflächlichen Gefäß entnommen.

Zur Gewinnung des Blutes wurde der Embryo steril aus der Eischale entfernt und in eine Petrischale verbracht. Das aus der Nabelvene ausgetretene und mit Eiweißflüssigkeit vermischte Blut wurde mit einer Spritze aufgezogen und im Verhältnis 2:1 mit PBS und Antibiotika vermischt. Je nach Befallsstärke wurden 0,1 - 0,2 ml auf ein Ei übertragen.

Technik der Eibeimpfung:

Markierung der unteren Luftkammergrenze und des Infektionsgebietes unter der Schierlampe. Die Infektionsstelle befand sich ca 1/2 cm unterhalb der Projektionsstelle des konvexen Bogens der Arteria umbilicalis sinistra (KÜNZEL 1962).

Die CAM-Beimpfung ohne Fensterung der Schale wurde nach den von A. MAYR und Mitarbeiter (1974) vorgeschlagenen Methode vorgenommen. Die Dottersackinokulation erfolgte ebenfalls nach der von A. MAYR und Mitarbeiter (1974) angegebenen Methode.

Die Parasitenübertragung in unbebrüteten Eiern:

1. Desinfektion des stumpfen Eipols und eines pfenniggroßen Stückes im seitlichen Bereich des spitzen Eipols. (Injektionsstelle)
2. Eröffnen der Schale über der Luftkammer und Injektionsstelle ohne Verletzung der Schalenhaut mit einer rotierenden Karborundscheibe.
3. Eröffnen der Schalenhaut über der Luftkammer zum Druckausgleich.
4. Nach Penetration der Schalenhaut, Injektion des Inokulums in das Eiklar (ca. 1 cm Tiefe).
5. Verschuß der Injektionsstelle und der Luftkammeröffnung mit flüssigem Paraffin.

Blutentnahme aus Gefäßen der CAM zur mikroskopischen Parasitenkontrolle: Markieren eines kleinen Gefäßes der CAM unter der Schierlampe. Eröffnen der Eischale und des Gefäßes mit einem Dentalbohrer. Auffangen des Blutes mit einer Injektionskanüle. Verschuß mit flüssigem Paraffin.

Zur Kontrolle des Virulenzverhaltens wurden Mäuse mit jeweils einem einzigen Erreger aus der Eipassage infiziert. Das Bluteiweißgemisch wurde mit BSG (Bicine-Solution-Glucose) hoch verdünnt. Das Gemisch wurde in feinst ausgezogenen Kapillaren unter dem Mikroskop untersucht. Kapillaren in denen ein einzelner Parasit festzustellen war,

wurden zur Infektion der Mäuse verwendet. Dazu wurde einer mit Nembutal^R (Pentobarbital) betäubten Maus die Bauchhöhle eröffnet und der Erreger dorthin verbracht (Methode DENNIG, unveröffentlicht).

Blut zur mikroskopischen Kontrolle und zu Übertragungsversuchen wurde bei Küken nach Punktion der Flügelvene bzw. bei Mäusen durch Kupieren der Schwanzspitze entnommen.

Die mikroskopische Untersuchung des parasitenhaltigen Blutes erfolgte alle 1 - 2 Tage im Nativpräparat.

Die Höhe der Parasitämie wurde dabei nach folgendem Schema beurteilt:

-	:	keine Trypanosomen in 50 Gesichtsfeldern (GF)	
		Objektivdurchmesser 40 x Okular 12,5	
(+)	:	1 - 6 Tryp./50 GF	
+	:	1 Tryp./ 10 GF	= 500 Tryp/mm ³ Blut
++	:	1 Tryp./ GF	= 1 000 Tryp/mm ³ Blut
+++	:	5 Tryp./ GF	= 5 000 Tryp/mm ³ Blut
++++	:	<50 Tryp./ GF	= 50 000 Tryp/mm ³ Blut
+++++	:	>50 Tryp./ GF	= >50 000 Tryp/mm ³ Blut

Ausstriche wurden nach der gebräuchlichen Methode Giemsa gefärbt.

Bei quantitativen Übertragungsversuchen wurde die Zahl der Parasiten nach folgender Methode bestimmt: 0,01 ml Blut aus der Maus oder aus dem Ei wurde mit physiologischer Kochsalzlösung und Trypanosomenzählflüssigkeit versetzt. Danach wurden in der Zählkammer nach THOMA die Trypanosomen ausgezählt. Das Mengenverhältnis betrug 0,33 ml NaCl-Lsg und 0,30 ml Trypanosomenzählflüssigkeit. Die von MÜHLPFORDT (1964) empfohlene Zählflüssigkeit setze sich aus 0,025 g

Phenol in 80 % Alkohol, 7 ml 40 % Formol und 18 ml Eisessig zusammen. Für die Versuche ergab sich jeweils durch Verdünnung des Blutes mit BSG-Puffer das gewünschte Inokulum.

Längenmessung der Trypanosomen:

Die Größenbestimmung der Trypanosomen wurde am Ausstrich (Giemsa) mit dem Zeichentubus (Vergrößerung mit Objektiv 100 x Okular 12,5 x Tubus 1,25) und einem Objektmikrometer durchgeführt.

B. Ergebnisse

1. Vergleich der Dottersack- mit der Chorio-Allantois-Membran-Übertragung (CAM)

Zur Untersuchung der geeignetsten Übertragungsmethode von *T. evansi* auf das embryonierte Hühnerei wurde die Dottersack- mit der CAM-Übertragung verglichen.

Als Inokulum wurde stark parasitenhaltiges Mäuseblut verwendet, die Bebrütungsdauer betrug nach der Parasitenübertragung 7 Tage. Das Alter der Embryonen bei der Dottersackinokulation lag bei 6 Tagen, da dieser Zeitpunkt für die Technik der Übertragung am besten geeignet ist. (MAYR und Mitarbeiter 1974) Bei der Übertragung auf die CAM betrug das Alter der Embryonen durchschnittlich 10 Tage.

Übertragung in den Dottersack:

Von 20 überlebten nach 7 tägiger Bebrütungsdauer 7 Embryonen. Bei 3 wurde eine Parasitämie festgestellt, während bei den restlichen 4 keine Trypanosomen nachweisbar waren.

Übertragung auf die CAM:

Von 20 infizierten Embryonen überlebten nach 7 tägiger Bebrütung 16. Bei 12 dieser Embryonen waren Trypanosomen im peripheren Blut nachzuweisen. 4 Embryonen waren nicht infiziert.

Auf Grund der geringeren Absterberate wurde im folgenden die CAM-Übertragung gewählt.

2. Passagierung von *T. evansi* im embryonierten Ei

Während eines Zeitraums von 41 Wochen wurden in 326 bebrüteten Hühnereiern 40 Passagen in einem Zeitintervall von jeweils

7 - 8 Tagen durchgeführt. Für die Anzüchtung wurde parasitenhaltiges Blut einer Maus, für die Passage Infektionsmaterial aus ca. 17 Tage alten Embryonen verwendet. Im allgemeinen wurden für jede Passage die überlebenden Embryonen von 10 bebrüteten Eiern infiziert. Die Passage erfolgte in 8 - 13 Tage alten Embryonen, die nach der Übertragung noch weitere 7 - 8 Tage bebrütet wurden. Am 7. - 8. Tag wurde die Parasitenkontrolle vorgenommen. Die für Passagematerial nicht benötigten Eier wurden bis zum Ende der Brutdauer weiterinkubiert, um Anhaltspunkte über den Schlupf zu erhalten. Zur Kontrolle eventuell auftretender Virulenzveränderungen wurden nach jeder Passage 3 Mäuse infiziert, wobei auf jede Maus jeweils 1 Parasit übertragen wurde.

Von 326 infizierten Eiern wiesen 208 (64 %) eine Parasitämie auf. Bei 118 (36 %) konnte keine Infektion nachgewiesen werden. 32 (10 %) infizierte Embryonen verendeten kurze Zeit nach der Trypanosomenübertragung, 281 (86 %) zwischen dem 17. - 20. Bebrütungstag.

13 Küken (4 %) schlüpften, wobei 5 (1,8 %) zum Zeitpunkt des Schlupfes einen Parasitenbefall aufwiesen.

Der Anteil, der zwischen dem 17. - 20. Bebrütungstag verendeten Embryonen verteilte sich, ebenso wie die Schlupfquote, gleichmäßig über die Dauer von 40 Passagen.

Bei einer Verkürzung des Passagierungsintervalls von 7 auf 5 Tage riß bei 3 Versuchsansätzen die Serie nach der 3. bzw. 4. Passage ab. Aufgrund der verkürzten Bebrütungszeit war das Ausgangsmaterial für die Inokula wesentlich geringer parasitenhaltig als am 7. - 8. Tag p.i..

Insgesamt wurden 4 Passageserien durchgeführt. 3 dieser Serien rissen wegen technischer Mängel zwischen der 9. und 18. Passage ab.

3. Verlauf der Parasitämie im Hühnerembryo

Für den Versuch wurden insgesamt 50 Eier bebrütet. 7 davon mußten wegen fehlender Befruchtung oder Absterben des Embryos verworfen werden. Die Parasitenübertragung erfolgte am 9. - 11. Bebrütungstag mit durchschnittlich 100 000 Trypanosomen in einem Inokulum von 0,15 ml pro Ei. In der Folgezeit wurde täglich von 2 Eiern quantitativ die Befallshöhe festgestellt.

Die ersten Trypanosomen traten frühestens 2 Tage p.i. auf. Bis zum 6. - 8. Tag entwickelte sich eine zunehmende Parasitämie. Der Tod der Embryonen trat am 19. - 20. Bebrütungstag, das heißt 9 - 10 Tage p.i. ein.

Abb. 1

Verlauf der Parasitämie im Hühnerembryo

1	2	3	4	5	6	7	8	9	Tg. p.i.
-	250	500	750	5000	50000	50000	>50000		Zahl d. Tryp./ 0,1 ml Blut

4. Die Übertragung von T. evansi auf unterschiedlich lang bebrütete Eier

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Empfänglichkeit und des Infektionsverlaufes vom Alter der Embryonen zum Zeitpunkt der Parasitenübertragung wurden insgesamt 261 Eier bebrütet und untersucht. Die Übertragung der Trypanosomen fand in folgenden Abständen statt:

Unmittelbar vor der Bebrütung	15 Eier
1. - 6. Bebrütungstag	45 Eier
7. - 13. Bebrütungstag	127 Eier
14. - 20. Bebrütungstag	74 Eier

Zur Kontrolle auf eine vorliegende Infektion wurden die Eier 3, 5 und 7 Tage p.i. geöffnet und auf die Anwesenheit von Trypanosomen mikroskopisch (Nativpräparat) untersucht.

Bei geschlüpften Küken wurde bis 1 Woche post natum täglich peripheres Blut, bei älteren Küken 1 x wöchentlich mikroskopisch und im biologischen Test (Rückübertragung auf Mäuse) untersucht. Blieb der 4. biologische Test negativ, so wurde der Versuch abgebrochen.

Parasitenübertragung vor der Bebrütung:

4/15 Eier waren unbefruchtet, 7 Embryonen gingen innerhalb der ersten 4 Bebrütungstage zu Grunde, der Parasitennachweis verlief negativ. Bei 4 der überlebenden Embryonen waren 8 Tage p.i. ebenfalls keine Parasiten nachweisbar.

Parasitenübertragung am 1. - 6. Bebrütungstag:

6/45 Eier waren unbefruchtet. Bei jeweils 5 Eiern des 1. und 2. Bebrütungstages wurden während der Untersuchungsperiode bis zum 7. Tag p.i. in keinem Fall Parasiten mikroskopisch festgestellt. Von 5 am 3. Bebrütungstag infizierten Eiern starb eines ab, bei 3 verlief der Parasitennachweis negativ. In einem Embryo wurden Trypanosomen festgestellt. Von 10 am 4. und 5. Bebrütungstag infizierten Eiern verendeten 5 Embryonen unmittelbar nach der Parasitenübertragung. 5 Embryonen überlebten, wovon 2 positiv waren. Von 20 am 6. Bebrütungstag infizierten Embryonen verendeten 12 kurz nach der Beimpfung. Nach 7 Tagen lebten noch 8, 2 davon waren positiv.

Parasitenübertragung am 7. - 13. Bebrütungstag:

Es wurden insgesamt 127 Eier infiziert. Von 62 Eiern, bei denen die Parasitenübertragung am 7. - 9. Bebrütungstag erfolgte, verendeten 3 Embryonen unmittelbar nach der Beimpfung. 50 waren positiv, bei 9 konnten keine Erreger nachgewiesen werden. Aus jeweils einem am 7. bzw. 9. Bebrütungstag infizierten Ei schlüpften Küken, die weder bei der mikroskopischen Parasitenkontrolle noch bei 4 biologischen Prüfungen (10., 18., 25. und 32. Tag p.n.) Trypanosomen aufwiesen.

Von 40 Eiern, die am 10. und 11. Bebrütungstag infiziert wurden, verendeten 2 Embryonen kurz nach der Beimpfung. Bei 19/24 Embryonen wurde eine Parasitämie festgestellt, 5 waren negativ. 2 Küken schlüpften aus am 11. Tag infizierten Eiern. Eines der Küken wies neben einem hochgradig persistierenden Dottersack eine massive Parasitämie auf, an der es einige Stunden p.n. zu Grunde ging. Bei dem anderen Küken wurden weder im Nativpräparat noch in biologischen Prüfungen (10, 18, 25, 32 Tg. p.n.) Trypanosomen beobachtet.

Von 25 am 12. Bebrütungstag infizierten Eiern starben 3 kurz nach der Parasitenübertragung ab. Bei 10 Embryonen war nach 7 Tagen ein Parasitenbefall nachzuweisen, während 5 weitere negativ blieben. 7 Küken schlüpften, 3 davon waren negativ. 2 Küken schlüpften mit massiver Parasitämie, an der sie 1 bzw. 3 Tage p.n. verendeten. Der Befall war bei einem Küken so stark, daß im Ausstrich mehr Trypanosomen als Erythrozyten zu beobachten waren. Eines der restlichen 2 Küken, es zeichnete sich durch Zwergwuchs und große Schwäche aus, war mikroskopisch negativ. Es verendete 3 Tage p.n.. Im biologischen Test

erwies es sich als positiv. Das 7. Küken schlüpfte mit hoher Parasitämie ohne klinische Symptome. Die Zahl der Trypanosomen im peripheren Blut nahm in der folgenden Zeit ab. Am 6. Tag p.n. waren mikroskopisch keine Parasiten mehr festzustellen. Ein nach 10 Tagen vorgenommener biologischer Test verlief positiv, die folgenden (18 , 25 , 32 Tg. p.n.) negativ.

Bei 22 am 13. Bebrütungstag infizierten Eiern verendeten 6 Embryonen innerhalb 24 Stunden nach der Beimpfung. 4/7 waren positiv, 3 negativ. 6 Küken waren beim Schlupf negativ, 3 zeigten eine sehr starke Parasitämie, an der sie 3 - 4 Tage p.n. verendeten. Auch bei diesen Tieren persistierte der Dottersack, weiterhin zeigten sie Freß- und Trinkunlust.

Parasitenübertragung am 14. - 20. Bebrütungstag:

Am 14. Bebrütungstag wurden 17 Embryonen infiziert, von denen 6 kurz nach der Parasitenübertragung verendeten. Aus den restlichen 11 Eiern schlüpften Küken, von denen bei 5 weder mikroskopisch noch im biologischen Test Trypanosomen festgestellt wurden. 2 Küken verendeten interkurrent wegen Heizungsausfalls. 2 Küken waren am Schlupftag positiv. Eines wies einen hohen Parasitenbefall auf, der sich bis zum 8. Tag, an dem es verendete, kontinuierlich verminderte. Das andere zeigte bis zum 5. Tag p.n. eine nur sehr schwache Parasitämie. Der am 10. Tag p.n. vorgenommene biologische Test verlief negativ. Im biologischen Test nach 18 Tagen erwies sich das Küken wieder als positiv, bei 2 folgenden als negativ.

Die beiden letzten Küken dieser Gruppe schlüpften relativ klein und schwach. Sie verendeten 6 Tage p.n., ohne daß zu

diesem Zeitpunkt Trypanosomen nachweisbar waren, im biologischen Test erwiesen sich jedoch beide Tiere als positiv.

Bei 22 am 15. Bebrütungstag infizierten Eiern verendeten 10 Embryonen kurz nach der Übertragung. Von 12 Küken waren 6 negativ. 3 Küken zeigten eine mittelgradige Parasitämie, die bis zum 3. Lebenstag konstant blieb und bis zum Tod 5 Tage p.n. weiter anstieg. Kurz vor dem Tod traten Ataxie, Freß- und Trinkunlust auf. Bei 3 weiteren Küken waren zum Zeitpunkt des Schlupfes im peripheren Blut vereinzelte Parasiten nachweisbar. Diese vermehrten sich bis zum 5. und 6. Tag p.n.. Am 7. Tag p.n. konnten keine Parasiten mehr nachgewiesen werden. Die biologischen Prüfungen (10 , 18 , 25 , 32 Tg. p.n.) verliefen negativ.

Bei 10 bebrüteten Eiern wurden die Trypanosomen am 16. Bebrütungstag übertragen, 5 Embryonen verendeten kurze Zeit danach. Von 5 geschlüpften Küken erwiesen sich 2 als negativ. Ein Küken war bis zur Durchführung des biologischen Testes 10 Tage p.n. mikroskopisch frei von Parasiten. Die erste biologische Prüfung verlief positiv, die 3 folgenden negativ. Bei den 2 restlichen Küken waren bis zum 4. Lebenstag im peripheren Blut vereinzelte Parasiten zu beobachten. Ab dem 5. Tag p.n. war das Blut mikroskopisch frei von Trypanosomen, ebenso verliefen die biologischen Prüfungen (10 , 18 , 25 , 32 Tg. p.n.) negativ.

Bei 10 Embryonen erfolgte die Übertragung am 17. Bebrütungstag, 2 verendeten unmittelbar danach. Von 8 geschlüpften Küken waren 4 negativ. Bei 3 Küken waren bis 4 Tage p.n. im Nativpräparat vereinzelte Parasiten festzustellen. Danach war das Blut mikroskopisch frei von Trypanosomen. Alle vier biologischen Prüfungen (10 , 18 , 25 , 32 Tg.p.n.)

verliefen negativ. Das letzte Küken war ebenfalls mikroskopisch frei von Parasiten, der erste biologische Test 10 Tage p.n. verlief positiv, die übrigen (10, 25, 32 Tg. p.n.) negativ.

Von insgesamt 22 Eiern, die am 18. - 20. Bebrütungstag infiziert wurden, starben 4 kurz nach der Parasitenübertragung ab. Alle 18 Küken erwiesen sich mikroskopisch und in biologischen Prüfungen als negativ.

Abb. 2

Die Übertragung von T.evansi auf unterschiedlich lang bebrütete Ei

Alter bei Infektion (Tg.)	Tod (x)	Embryo		Küken		Zahl in- fizierte Eier
		pos.	neg.	pos.	neg.	
xx) 0	11	-	4	-	-	15
1	-	-	5	-	-	5
2	2	-	3	-	-	5
3	1	1	3	-	-	5
4	2	1	2	-	-	5
5	3	1	1	-	-	5
6	12	2	6	-	-	20
7	-	15	4	-	1	20
8	-	17	3	-	-	20
9	3	16	2	-	1	22
10	2	14	4	-	-	20
11	-	15	3	1	1	20
12	3	10	5	4	3	25
13	6	4	3	3	6	22
14	6	-	-	6	5	17
15	10	-	-	6	6	22
16	5	-	-	3	2	10
17	2	-	-	4	4	10
18	1	-	-	-	5	6
19	1	-	-	-	6	7
20	2	-	-	-	7	9

x) Eintritt des Todes unmittelbar nach Übertragung des Inokulums

xx) Übertragung wurde vor Beginn der Bebrütung vorgenommen

5. Prüfung des Virulenzverhaltens von T. evansi während der Eipassagen

Im Laufe der Untersuchung sollte geprüft werden, ob eine Virulenzveränderung der Trypanosomen während der Passagen 1 - 40 eintritt. Hierfür wurden aus einem infizierten Embryo jeder Passage jeweils 3 Trypanosomen isoliert und auf jeweils 3 Mäuse übertragen. Zum Vergleich wurden in entsprechender Weise Mäuse mit jeweils einem Parasiten des T. evansi Ausgangsstammes infiziert.

Bei allen Mäusen traten die ersten Trypanosomen 6 - 9 Tage p.i. im peripheren Blut auf. Nach ansteigender Parasitämie verendeten die Versuchstiere am 9. - 15. Tag p.i. Eine unterschiedliche Verlaufsform der Infektion wurde bei den beiden Gruppen nicht beobachtet.

6. Morphologisches Verhalten von T. evansi im Laufe der Passagen

Die Trypanosomen aus Embryonen der 1. - 40. Eipassage wurden im gefärbten Ausstrich (Giemsa) mit Trypanosomen der Mäusepassage hinsichtlich des Längenwachstums verglichen. Die Messung der Parasiten wurde nach jeder 5. Eipassage durchgeführt.

Die Länge von den Trypanosomen der 40 Eipassagen unterschied sich nicht signifikant von der Länge der Trypanosomen aus Mäusepassagen. Das Ergebnis der Messungen ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Abb. 3

Vergleich der Länge von Ei- und Mäuse-passagierten Trypanosomen:

Eipassage (μ m)	Mäusepassage (μ m)
27,5 - 30,1 ($\varnothing$ 29,0)	27,2 - 29,9 ($\varnothing$ 28,9)

7. Bestimmung der zur Infektion von Hühnerembryonen notwendigen Erregerzahl

Die Untersuchungen wurden mit Trypanosomen durchgeführt, die entweder aus Mäusen oder aus der 2. bzw. 10. Eipassage stammen. Zur Infektion wurden jeweils 8 Gruppen mit 5 Eiern, die 10 Tage bebrütet waren, verwendet. Die Inokula enthielten jeweils 1 000 000, 500 000, 100 000, 50 000, 10 000, 5 000, 2 500, 1 000, 750 und 500 Parasiten. Die mikroskopische Blutuntersuchung erfolgte nach 7 Tagen Bebrütungsdauer.

Die Übertragung von 500, 750 und 1 000 Trypanosomen pro Ei aus der Mäusepassage führte bei den Embryonen zu keiner Infektion. 2 500 Parasiten führten zu einer Infektion, die durch eine schwache Parasitämie gekennzeichnet war. Alle Inokula mit höherer Erregerzahl führten zur massiven Parasitämie.

Die Übertragung mit Trypanosomen aus der Eipassage führte mit 500 und 750 Parasiten pro Ei zu keiner Infektion der Embryonen. Alle höheren Inokula verursachten eine Infektion, die bei 1 000 Parasiten pro Ei nach 7 Tagen Bebrütungszeit eine etwas schwächere Parasitämie als bei den höheren Konzentrationen aufwies.

8. Die T. evansi-Infektion im Küken

Für die Untersuchungen wurden 52 Küken im Alter von 1 - 5 Tagen mit 1 - 1,5 Mio Trypanosomen pro Versuchstier intraperitoneal infiziert. Die Untersuchung der Küken erfolgte mikroskopisch im Blutnativpräparat bzw. im biologischen Test.

18/27 Eintagsküken erwiesen sich als resistent. Bei einem Küken lag 130 Tage lang eine mikroskopisch nicht erfaßbare, latente Infektion vor. Klinische Erscheinungen wurden nicht beobachtet. Bei 6 Küken war 2 - 3 Tage p.i. eine schwache Parasitämie festzustellen, danach war das Blut mikroskopisch negativ. 5 der Küken erwiesen sich im biologischen Test 40 Tage lang als latent infiziert, eines war schon nach dem ersten biologischen Test (10 Tg. p.i.) negativ. Bei einem weiteren Küken wurden bis zum 7. Tag p.i. mikroskopisch keine Parasiten nachgewiesen, am 8. und 9. Tag p.i. bestand eine geringgradige Parasitämie, die am 10. Tag wieder verschwand. Bis zum 20. Tag p.i. bestand eine latente, durch den biologischen Test nachgewiesene, Infektion, danach war das Tier frei von Parasiten. Bei 2 Küken wurden zu keinem Zeitpunkt nach der Infektion Trypanosomen im peripheren Blut festgestellt. Es bestand jedoch eine 14tägige, im biologischen Test bestätigte, latente Infektion.

11/13 Küken im Alter von 2-3 Tagen erwiesen sich als resistent. Bei einem 2 Tage alten Küken wurde 2 Tage p.i. eine schwache Parasitämie beobachtet, in folgenden biologischen Prüfungen erwies es sich dann als negativ. Ein am 3. Tag p.n. infiziertes Küken war 112 Tage lang mikroskopisch negativ, im biologischen Test jedoch positiv. Diese Küken, ebenso wie das Eintagsküken der ersten Gruppe (130 Tage latent infiziert), erkrankten im Alter von 3-4 Wochen ca. 14 Tage

lang an einer mit starken klinischen Symptomen verbundenen E.coli Infektion, die durch eine Behandlung mit Chloramphenicol erfolgreich therapiert wurde.

10 Küken im Alter von 4 und 5 Tagen erwiesen sich als resistent.

Übertragungsversuche von Küken zu Küken

Jeweils 0,2 ml Blut eines Kükens mit hoher Parasitämie (50 000 Tryp./0,1 ml Blut) wurde 2 Eintagsküken intraperitoneal verabreicht. Bei beiden Küken traten 2 Tage p.i. vereinzelt Trypanosomen im peripheren Blut auf. Eine starke Vermehrung der Parasiten wurde bis zum Tod der Küken am 5. Tag p.i. beobachtet.

Jeweils 0,2 ml Blut eines Kükens mit schwacher Parasitämie (1000 Tryp./0,1 ml Blut) wurden 2 Eintagsküken i.p. übertragen. Beide Küken blieben mikroskopisch negativ. Ein 3 Tage p.i. durchgeführter biologischer Test verlief positiv, 3 weitere (10, 18, 25 Tg. p.i.) negativ.

Jeweils 0,2 ml Blut eines latent infizierten Kükens (Infektion nur durch den biologischen Test nachgewiesen) wurde 2 Eintagsküken i.p. verabreicht. Im Laufe von 37 Tagen waren Trypanosomen weder mikroskopisch noch im biologischen Test nachzuweisen.

9. Überlebenszeit von T. evansi im unbebrüteten Hühnerei

In diesem Versuch war zu prüfen, ob ein Überleben von T. evansi im unbebrüteten Ei möglich ist und welchen Einfluß die Temperatur in einem Bereich von + 5°C (Kühlschrank), + 22°C (Zimmertemperatur) und + 37°C (Brutschrank) auf die Überlebenszeit der Parasiten hat. Insgesamt wurden 20 Eier

infiziert. Die Trypanosomen wurden in das Eiklar übertragen. Die Überlebenszeit wurde täglich im Nativpräparat, die Infektiosität durch Übertragung des Eimaterials auf Mäuse geprüft. Als Infektionsmaterial wurde Eiklar und Dotter verwendet.

Bei Kühlschranktemperatur ($+ 5^{\circ}\text{C}$) wurden nach 24 Stunden neben zahlreichen unbeweglichen und deformierten Parasiten vereinzelte bewegliche Trypanosomen beobachtet. Am 2. Tag und danach wurden keine motilen Trypanosomen mehr festgestellt. Die Infektiosität war am 1. Tag p.i. erhalten. Die Präpatenzzeit betrug bei Mäusen bis zu 15 Tage im Gegensatz zu 3 - 5 Tage bei Kontrollen. Die Patenzzeit von durchschnittlich 5 - 6 Tagen veränderte sich nicht.

Bei Zimmertemperatur ($+ 22^{\circ}\text{C}$) betrug die Überlebenszeit von T. evansi 9 Tage. Die Zahl der gut beweglichen Trypanosomen nahm von Tag zu Tag ab. In zunehmendem Maße wurden unbewegliche Parasiten mit verminderter Beweglichkeit oder in Auflösung begriffenen Formen beobachtet. Als Degenerationsformen traten doppelt begeißelte Parasiten, runde und Trypanosomen mit schwacher Lichtbrechung auf.

Die Infektiosität bestand 4 Tage. Die Präpatenzzeit blieb unbeeinflusst.

Bei Brutschranktemperatur ($+ 37^{\circ}\text{C}$) betrug die Überlebenszeit 48 Stunden. Neben zahlreichen Degenerationsformen waren in dieser Zeit auch gut bewegliche Trypanosomen zu erkennen. Die Infektiosität der Trypanosomen war 48 Stunden erhalten. Eine Veränderung der Präpatenzzeit trat nach 24 Stunden bei übertragenen Parasiten nicht auf. Am 2. Tag wurde eine Verschiebung bis zu 11 Tagen beobachtet.

IV. Besprechung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob *T. evansi*, Stamm Bali, auf dem embryonierten Hühnerei anzuzüchten und kontinuierlich zu passagieren ist. Weiterhin war zu prüfen, ob Veränderungen der Virulenz oder der morphologischen Struktur im Laufe der Eipassagen auftreten und ob Hühner eventuell als Infektionsträger in Frage kommen.

Bis zum Abschluß der Untersuchungen wurden innerhalb von 41 Wochen 40 Passagen auf dem bebrüteten Hühnerei durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, daß diese Trypanosomenart ohne größere Schwierigkeiten im Hühnerembryo zu vermehren und zu passagieren ist. Das Ergebnis der Untersuchungen weist darauf hin, daß sich der Parasit bei kontinuierlicher Passagierung unbegrenzt auf dem bebrüteten Hühnerei züchten läßt. Damit stehen meine Versuchsergebnisse weitgehend im Einklang mit den Beobachtungen von HALLAUER und KUHN (1940), die nach 22 Eipassagen von *T. brucei* den Versuch abbrachen, weil sie der Ansicht waren, daß diese Parasitenart auch weiterhin ohne Schwierigkeiten auf dem embryonierten Ei zu halten ist. Auch CHABAUD (1939) kam mit seinen Passagierungsversuchen mit *T. brucei*, *T. rhodesiense* und *T. equinum* ebenso wie NAKABAJASHI und MOTOMURA (1966) mit *T. gambiense* zu einem ähnlichen Ergebnis. Im Gegensatz zu den genannten Trypanosomenarten war eine Anzüchtung von *T. congolense*, *T. vivax* und *T. lewesi* nicht möglich, wie CHABAUD (1939) und GOEDBLOED und KINYANJUI (1970) in mehreren Versuchen nachwiesen. Die Frage, ob diese Trypanosomenarten generell auf dem embryonierten Hühnerei nicht zu kultivieren sind, läßt sich aufgrund der begrenzten Zahl der Untersuchungen

nicht beantworten. Die Mißerfolge bei der Anzüchtung könnten unter Umständen auch darauf zurückzuführen sein, daß mit alten, an Labortiere adaptierten Stämmen gearbeitet wurde. LONGLEY, CLAUSEN und TATUM (1939) war es ebenfalls nicht möglich, *T. evansi* über eine nur eng begrenzte Passagenzahl hinweg auf bebrüteten Hühnereiern zu halten. Da eine Wiederholung des Versuchs nicht vorgenommen wurde, liegt die Vermutung nahe, daß der plötzliche Abbruch durch eine technische Unzulänglichkeit bedingt war.

Die Passagen wurden jeweils im Abstand von 7 Tagen vorgenommen. In diesem Zeitraum entwickelte sich eine so starke Parasitämie, daß in jedem Inokulum eine ausreichende Zahl von Trypanosomen gewährleistet war. Bei einem Passageintervall von 5 Tagen wurde dagegen eine genügend hohe Parasitenzahl pro Inokulum nicht erreicht.

Die Art der Parasitenübertragung hat offensichtlich auf den Erfolg der Infektion keinen wesentlichen Einfluß. Bei der Beurteilung der in der Literatur vorliegenden Arbeiten stellte es sich heraus, daß ALTURE-WERBER (1948) mit der Dottersackinokulation gute Infektionsergebnisse erzielte, wogegen KAWECKI und MORZYCKY (1953) mit der Übertragung auf die CAM bessere Erfolge hatten.

In eigenen Versuchen wurden beide Infektionstechniken mit Erfolg durchgeführt. Bei der Beimpfung der CAM lag die Infektionsrate höher und die Absterbequote niedriger als bei der Dottersackinokulation. Dieses Resultat hängt sicherlich mit der morphologischen Struktur der CAM zusammen. Als einschichtiges Epithel, wie es am 7. - 13. Bebrütungstag vorliegt, hat die Membran eine hohe resorptive Kapazität. Durch die starke Bewegungsaktivität dürften die Trypanosomen sehr schnell in das Kapillarsystem und

damit in den Blutkreislauf des Embryos gelangen. Bedingt durch die oberflächliche Verabreichung des Inokulums, scheint eine Traumatisierung des Embryos nicht, oder nur in Ausnahmefällen stattzufinden, was in der geringeren Absterbequote zum Ausdruck kommt. Bei der Dottersackinokulation liegen weniger günstige Verhältnisse vor. Der Traumatisierungseffekt ist höher, da das relativ große Inokulum, es wurden im allgemeinen Inokula von 0,1 - 0,2 ml verabreicht, in unmittelbare Nachbarschaft des Embryos verbracht wird, und damit die Gefahr einer Schädigung nahe liegt. Die höhere Absterbequote bei der Dottersackinokulation muß auf diese Tatsache zurückgeführt werden. Was die niedrigere Infektionsrate bei dieser Übertragungsart betrifft, so könnte sie durch die dichte Konzentration der Depotstoffe bedingt sein, die einen Übertritt der Parasiten in die Blutbahn durch mechanische Einschränkung der Motilität erschwert.

Die Untersuchungen hinsichtlich der Vermehrung der Parasiten im Embryo ergaben, daß schon 2 Tage p.i. die ersten Erreger im peripheren Blut auftraten und sich bis zum 7. - 8. Tag so stark vermehrten, daß sie den Tod der Embryonen 9 - 11 Tage p.i. verursachten. LONGLEY, CLAUSEN und TATUM (1939) und VAN DEN BERGHE (1943) sowie CHABAUD (1939), HALLAUER und KUHN (1940), ALTURE-WERBER (1948), HOOD (1948), KAWECKI und MORZYCKI (1953), NAKABAJASHI und MOTOMURA (1966) und GOEDBLOED und KINYANJUI (1970) kamen bei ihren Untersuchungen mit verschiedenen Trypanosomenarten zu ähnlichen Ergebnissen. Auch bei diesen Parasitenarten fand im Laufe der ersten 8 Tage eine starke Vermehrung statt, die bei der Mehrzahl der Embryonen zum Tode führte. Im Einklang mit HALLAUER und KUHN (1940),

VAN DEN BERGHE (1943), HOOD (1948) und GOEDBLOED und KINYANJUI (1970) stellte auch ich die Trypanosomen im Gefäßsystem der Embryonen fest. Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen von BIENZ (1967), der *T. brucei* auch in der Allantoishöhle nachwies. Der Autor beschrieb die in der Allantoisflüssigkeit beobachteten Parasiten als Kulturformen, wie sie häufig bei der Züchtung von Trypanosomen mit zyklischer Übertragung auftreten.

Aus welchen Gründen diese Kulturformen in den Versuchen von BIENZ vorkamen, während sie in den Arbeiten anderer Autoren mit der gleichen Erregerart nicht festgestellt wurden, läßt sich im Augenblick nicht klären. Aufschluß müßten weitere, systematische Untersuchungen bringen. Da meine Versuche mit *T. evansi* durchgeführt wurden, waren Kulturformen, die mit Vektorenformen identisch sind, naturgemäß nicht zu erwarten, da *T. evansi* ausschließlich auf mechanische Weise übertragen wird und eine zyklische Entwicklung im Überträger fehlt. Eine Vermehrung von *T. evansi* im Gewebe wie sie von GANAPATI (1948), PIPKIN (1960) und MELLO und DEANE (1975) bei *T. cruzi* beschrieben wurde, trat bei meinen Versuchen ebenfalls nicht auf. Ein solches Ergebnis war jedoch nicht zu erwarten, da es sich bei *T. evansi* ausschließlich um einen Blutparasiten handelt, während *T. cruzi* vorwiegend als Gewebeparasit, und nur in Ausnahmefällen im Blut nachweisbar ist.

Einen deutlichen Einfluß auf die Empfänglichkeit der Hühnerembryonen hatte auch der Zeitpunkt der Parasitenübertragung. Bis zum 6. Bebrütungstag war eine Infektion nur sehr selten möglich, da die Absterbequote, wahrscheinlich durch Impftraumata, hoch lag. Als optimaler Zeitraum für die Übertragung von Trypanosomen erwies sich der 7. - 13. Bebrütungstag. Hierbei entwickelte sich in 60 - 70 % der

Eier nach 7 Tagen eine massive Parasitämie, die bei der Mehrzahl der Embryonen zum Tod führte. Vereinzelt geschlüpfte Küken verendeten mit starkem Parasitenbefall einige Stunden post natum. Wurden die Erreger zu einem späteren Zeitpunkt übertragen, war sowohl die Infektionsrate als auch die Absterbequote niedriger. Die Zahl der geschlüpften Küken stieg. Am ersten Lebenstag wiesen die Tiere meist eine schwache bis mittelgradige Parasitämie auf. Diese verstärkte sich entweder allmählich und führte zum Tod, oder wurde schwächer und hatte eine Sterilisatio zur Folge. Ab dem 18. Bebrütungstag widerstanden die Embryonen der Infektion. Im Einklang mit meinen Versuchsergebnissen fanden auch CHABAUD (1939), HALLAUER und KUHN (1940) und HOOD (1948), daß sich der 7. - 13. Bebrütungstag am besten zur Kultivierung eignete. Weniger günstig erwies sich, auch bei den anderen Autoren, die Parasitenübertragung zu einem späteren Zeitpunkt. So verhielten sich bei VAN DEN BERGHE (1943) die Embryonen nach dem 15. Bebrütungstag überhaupt resistent. Eine Ausnahme bildeten die Beobachtungen von HALLAUER und KUHN (1940), bei denen eine Parasitenübertragung auf 18 - 20 Tage alte Embryonen zur Infektion führte. Die geschlüpften Küken verendeten ausnahmslos mit hohem Parasitenbefall.

Die Versuchsergebnisse von MITCHELL und MITARB. (1939) decken sich weitgehend mit den eigenen. Auch diesen Autoren gelang die Infektion nur bis zum 13. Bebrütungstag. Die geschlüpften Küken wiesen gelegentlich ebenfalls einen Parasitenbefall auf, der sich entweder zu einer hohen Parasitämie mit Todesfolge oder zur Sterilisatio entwickelte.

In der vorliegenden Literatur fehlen leider Angaben über Infektionsversuche während der ersten Bebrütungstage. Die hohe Absterberate, die ich bei der Beimpfung bis zum 6. Bebrütungstag beobachtete, dürfte im wesentlichen durch eine mechanische Schädigung der Embryonen bedingt sein, entweder verursacht durch den Infektionsprozess, oder durch die Trypanosomen selbst. Auch das im Inokulum enthaltene Fremdeiweiß des Mäuseblutes könnte als Noxe angesehen werden. Als weitere Möglichkeit muß in Betracht gezogen werden, daß das kaum ausgebildete Gefäßsystem ein Hindernis für das Angehen der Infektion darstellt. Ab dem 7. Tag ist das Gefäßsystem, darin stimmen auch die Untersuchungen von VAN DEN BERGHE (1943) und HOOD (1948) überein, wesentlich besser ausgebildet, so daß die Trypanosomen ein für sie geeigneteres Milieu vorfinden. Zu diesem Zeitpunkt dürfte auch der weiterentwickelte Embryo widerstandsfähiger gegenüber einer Traumatisierung bei der Parasitenübertragung geworden sein. Was die relativ hohe Widerstandsfähigkeit der 14 - 19 Tage alten Embryonen betrifft, so ist meines Erachtens die zu diesem Zeitpunkt beginnende Entwicklung des Immunsystems ausschlaggebend, ein System, mit dem auch VAN DEN BERGHE (1943) sein Mißlingen der Übertragungsversuche ab dem 16. Bebrütungstag begründete. Über die Immunreaktion der Hühnerembryonen auf parasitäre Infektionen ist nur wenig bekannt. Eine Interpretation möglicher immunologischer Reaktionen in Verbindung mit den beschriebenen Versuchen ist daher weitgehend hypothetisch. Es wäre jedoch denkbar, daß das häufige Mißlingen der Übertragung von *T. evansi* und anderen Trypanosomenarten, oder die geringeren Befallshöhen, die während der letzten Bebrütungswoche beobachtet wurden, auf das in den Embryonen dieser Altersklasse sicherlich differenziertere ausgebildete Immunsystem zurückzuführen ist.

Die Beimpfung älterer Embryonen und geschlüpfter Küken führte zu unübersichtlichen Ergebnissen. Während der größere Teil der Embryonen der Infektion widerstand, bildete sich bei einem geringeren Prozentsatz Infektionen unterschiedlichen Grades aus. Entweder kam es zu einer hohen Parasitämie mit Todesfolge, oder zu einer schwachen Parasitämie, die sich kurz nach dem Schlupf in eine Sterilisatio umwandelte, oder aber zu einem Parasitenbefall, der erst nach dem Schlupf auftrat. Für solche Unterschiede des Infektionsverlaufes könnte der individuelle Immunstatus der einzelnen Küken verantwortlich sein. Wie auch bei Säugetieren bekannt ist, treten bei den einzelnen Individuen große Unterschiede auf. Dieses Phänomen wurde auch bei infektiösen Erkrankungen in Geflügelbeständen beobachtet und könnte eventuell in Verbindung mit meinen Versuchen in Betracht gezogen werden. Neben dem individuellen Immunstatus spielen zweifellos noch andere Faktoren eine Rolle, zum Beispiel die primäre Resistenz. Geflügel weist gegenüber säugetierpathogenen Trypanosomenarten eine hohe Resistenz auf, die letzten Endes dazu führt, daß diese Tiere nicht als natürliche Endwirte in Frage kommen. Die Versuchsergebnisse von HALLAUER und KUHN (1940), MITCHELL und MITARB. (1939), HOOD (1948) und MISRA und CHOUDHURY (1976), die zwar Küken aber keine ausgewachsenen Hühner infizieren konnten, lassen die Vermutung zu, daß bei ausgewachsenem Geflügel, wahrscheinlich in Verbindung mit der besser ausgebildeten Immunität, eine stärkere Resistenz bestand. Ob die von SCHILLING (1904) und GOEBEL (1906 und 1908) gelungene Infektion mit *T. brucei* bei adulten Gänsen und Hühnern auf ein geschädigtes Immun- beziehungsweise Resistenzverhält-

nis zurückzuführen ist, muß dahingestellt bleiben. Es scheint jedoch eher möglich, daß in diesem Fall die Virulenz des betreffenden Stammes ausschlaggebend war. Es ist unwahrscheinlich, daß die Art der Parasitenübertragung, die bei diesen Versuchen gewählt wurde, von wesentlicher Bedeutung für das Angehen der Infektion war. GOEBEL (1906) injizierte die Trypanosomen in Kamm und Kehllappen der Hühner, also Stellen mit niedriger Temperatur. Er vermutete, daß damit eine allmähliche Adaptation der Erreger an die höhere Körpertemperatur des Geflügels besser gewährleistet war. Es sollte jedoch beachtet werden, daß die Blutparasiten schnell über die Kapillaren in das Gefäßsystem von Kamm und Kehllappen und damit in den Körperkreislauf gelangen. In meinen Versuchen zeigte sich jedenfalls bei der intraperitonealen Injektion von Küken keine Anzeichen, daß die höhere Körpertemperatur von Nachteil war.

Meine Infektionsversuche ergaben weiter, daß 25 % der Küken bis zu einem Alter von 3 Tagen für *T. evansi* empfänglich waren, während sich ältere Küken resistent verhielten. In 2 Fällen bestand eine latente Infektion über 4 Monate hinweg, bei der Mehrzahl der Tiere stellte sich jedoch nach ca. 30 Tagen eine Sterilisatio ein. HOOD (1948) beschrieb bei ihren Übertragungsversuchen mit *T. brucei*, *T. equiperdum* und *T. hippicum* ebenfalls den Ausnahmefall einer 4 Monate dauernden Infektion, der den beiden in meinen Versuchen aufgetretenen, sowohl hinsichtlich der Infektionsdauer als auch des Infektionsverlaufes gleicht. Unter Umständen könnten Streßfaktoren für dieses ungewöhnliche Verhalten verantwortlich gemacht werden. Im Laufe meiner Versuche erkrankten nämlich beide Küken im Alter von 3 - 4 Wochen an einer bakteriellen Infektion mit starken klinischen Symptomen,

die zweifellos zu einer erheblichen Resistenzschwächung der Tiere geführt hatte.

Eine Passagierung von Küken auf Küken war, wie auch ALWAR und RAMANUJACHARI (1953) mit *T. evansi* und FAGARD, CHARDOME und PEEL (1962) mit *T. brucei* nachwiesen, nur ganz vereinzelt möglich. In eigenen Versuchen gelang eine Passagierung von *T. evansi* nur, wenn das Blut des Ausgangstieres deutlich parasitenhaltig war. Eine Blutübertragung aus latent infizierten Küken auf andere führte zu keiner Infektion. ALWAR und RAMANUJACHARI (1952) glaubten durch ihre Trypanosomenübertragung auf Küken eine Erklärung für das Ausbrechen der Surra in bestimmten ländlichen Gebieten gefunden zu haben. Meines Erachtens hat jedoch das Geflügel in der Epidemiologie der *T. evansi*-Infektion keine Bedeutung. Da die Mehrzahl der Küken und Hühner, wie auch in meinen Versuchen gezeigt wurde, nur latent infiziert ist, könnte die Infektion bestenfalls beim Zusammentreffen mehrerer, die Übertragung begünstigender Faktoren weitergegeben werden.

Für das Zustandekommen der *T. evansi*-Infektion im Embryo wird eine bestimmte Mindestzahl von Trypanosomen benötigt. Die Anzüchtung der Parasiten auf dem bebrüteten Hühnerei gelang dann, wenn durchschnittlich 2 500 Trypanosomen übertragen wurden. Zur Passagierung reichte ein Minimum von 1 000 Erregern aus. Nach dem Angehen der Infektion bestand zwischen der Höhe des Inokulums und der Stärke der Parasitämie kein Zusammenhang. KAWECKI und MORZYCKI (1953) machten bei der Übertragung von *T. equiperdum* eine ähnliche Erfahrung. Sie benötigten mehr als 20 000 Erreger, um den Embryo mit Erfolg zu infizieren. Im Gegensatz hierzu steht die hohe Zahl von Trypanosomen, die ALTURE-

WERBER (1948) verabreichen mußte, um eine Vermehrung von *T. equiperdum* in bebrüteten Eiern zu erreichen. Die Infektion verlief nur dann positiv, wenn mehr als 150 000 Parasiten übertragen wurden. Eine Erklärung für die zur Infektion benötigten unterschiedlich hohen Inokula dürfte in der Art der Übertragung liegen. In meinen und in den Versuchen von KAWECKI und MORZYCKI (1953) werden die Parasiten auf die CAM verbracht, bei ALTURE-WERBER (1948) dagegen in den Dottersack. Aus den schon anfangs bei der Dottersackinokulation besprochenen Gründen liegt die Vermutung nahe, daß in diesem Milieu mehr Trypanosomen zu Grunde gehen.

Für das Zustandekommen einer Infektion ist eine Mindestzahl von Trypanosomen notwendig. Wird diese Zahl unterschritten, so können offensichtlich die körpereigenen Abwehrmechanismen die Infektion neutralisieren. Bei der Mindestzahl bzw. bei deren Überschreitung reicht das Abwehrsystem nicht mehr zur Unterdrückung der Infektion aus, es entwickelt sich eine Parasitämie und deren Folgen. Aus diesem Grund dürfte sich das bebrütete Hühnerei, im Gegensatz zur hochempfindlichen Maus, bei der 1 Parasit für das Zustandekommen einer Parasitämie genügt, nicht für den biologischen Test, das heißt zum Nachweis latenter Infektionen, eignen.

Im Laufe von 40 Eipassagen, die ich während meiner Untersuchungen durchführte, trat bei den Trypanosomen keine Virulenzveränderung auf. Zu einem ähnlichen Resultat kamen auch HALLAUER und KUHN (1940) mit *T. brucei*, NAKABAJASHI und MOTOMURA (1966) mit *T. gambiense* und LONGLEY, CLAUSEN und TATUM (1939) mit *T. evansi* in ihren Versuchen. Aller-

dings kann bei der relativ geringen Zahl von maximal 40 Passagen eine gravierende Veränderung der Parasiten nicht erwartet werden, insbesondere bei einem Medium, das für die Züchtung von *T. evansi* so geeignet erscheint.

Während meiner Versuche traten im Hühnerembryo und im Küken hinsichtlich der Größe und der morphologischen Struktur keine Veränderungen auf. Die schlanken und gut beweglichen Parasiten mit deutlichen Kinetoplasten veränderten ihre Größe von durchschnittlich 29 μ m während der Eipassagen nicht. Leider fehlen vergleichbare Angaben. HALLAUER und KUHN (1940) beobachteten das Auftreten von morphologisch veränderten Trypanosomen, die sie als Degenerationsformen beschrieben, während der 10. - 12. Eipassage und MISRA und CHOUDHURY (1976) stellen im Küken eine Längenreduktion von *T. evansi* gegenüber der gleichen Spezies aus dem Rind fest. Eine Erklärung für das unterschiedliche morphologische Verhalten kann ich, wenn man von einer art- oder stammesbedingten Besonderheit absieht, nicht geben.

Die Untersuchungen zur Überlebenszeit von *T. evansi* im unbebrüteten Hühnerei zeigten, daß sich zur Lebenderhaltung die Zimmertemperatur (+ 22°C) am besten eignet. Unter diesen Verhältnissen überlebten die Trypanosomen 9 Tage, wobei die Infektiosität über 4 Tage erhalten blieb. Da das unbebrütete Hühnerei offensichtlich ein günstiges "Erhaltungsmedium" für *T. evansi* darstellt, könnte man es unter Umständen als einfache Möglichkeit für Transport oder Aufbewahrung von *T. evansi* verwenden.

Abschließend läßt sich sagen, daß im Hinblick auf die günstigen Züchtungsversuche von *T. evansi* im Hühnerembryo, zumindest für diesen Parasitenstamm, die These von OAG (1940): daß das embryonierte Hühnerei kein geeignetes Medium für Trypanosomen sei, keine Gültigkeit hat.

V. Zusammenfassung

Die Arbeit befaßt sich mit der Übertragung von *T. evansi*, Stamm Bali, auf das embryonierte Hühnerei und auf Küken.

Innerhalb von 41 Wochen wurden 40 Eipassagen durchgeführt. Der geeignetste Zeitraum zur Passagierung lag zwischen dem 7. - 13. Bebrütungstag. Bei 7 - 13 Tage alten Embryonen entwickelte sich nach 7 - 8 Tagen stets eine massive Parasitämie. Sie führte bei der Mehrzahl der Embryonen zum Tod.

Aus Eiern, die am 14. - 17. Bebrütungstag infiziert wurden, schlüpften zu einem hohen Prozentsatz Küken mit schwacher bis mittelgradiger Parasitämie. Bei 3 - 6 Tage bebrüteten Eiern entwickelte sich nur ausnahmsweise, bei weniger als 3 Tage in keinem Fall eine Infektion. Für die Anzüchtung von *T. evansi* im embryonierten Ei war eine Mindestzahl von durchschnittlich 2 500 Parasiten notwendig, zur Passage reichten durchschnittlich 1 000 Trypanosomen aus.

Eine Veränderung der Infektiosität oder Virulenz der Trypanosomen gegenüber Mäusen wurde während der 40 Eipassagen nicht beobachtet. Morphologische Veränderungen insbesondere hinsichtlich des Längenwachstums traten während dieser Zeit ebenfalls nicht auf.

Küken, die nach der embryonalen Infektion schlüpften, verendeten entweder in Folge eines hochgradigen Parasitenbefalls, oder sie entwickelten 10 - 18 Tage p.i. eine Sterilisatio. Die Infektion von Küken gelang bis zum 3. Lebens- tag bei ca. 25 % der Fälle. Bei der Mehrzahl der Küken trat nach ca. 30 Tagen eine Sterilisatio ein. Bei 2 Küken wurde eine durchschnittlich 121 Tage anhaltende latente Infektion beobachtet.

Im unbebrüteten Hühnerei überlebte *T. evansi* bei
Zimmertemperatur bis zu 9 Tagen.

Summary

THE INOCULATION OF TRYPANOSOMA EVANSI (STRAIN BALI) IN EMBRYONATED CHICKEN EGGS AND IN HATCHED CHICKS

Within 41 weeks 40 passages of T.evansi in developing chicks were carried out.

For infection 7-13 days old embryos proved to be most suitable. Heavy parasitemias developed in general within 7-8 days. Death followed in most of the cases.

A high percentage of chicks hatched out of eggs, being inoculated on the 14th - 17th day.

In 3-6 days old embryos an infection with T.evansi was unusual, in younger ones not possible.

For the cultivation of T.evansi in developing eggs a minimum of about 2 500 parasites was necessary. For serial passages a number of 1 000 trypanosomes was sufficient.

Changes of virulence of infectivity to mice did not occur. Also no morphological changes, especially concerning the length, occurred during this time.

Chicks infected some days prior to hatching either died by a severe parasitemia, or developed a sterilisatio after 10-18 days p.n..

Chicks could be infected to the third day of life. 25 % developed an inapparent infection for 40 days, 2 chicks showed an inapparent infection for 121 days.

In not incubated eggs, T.evansi was kept alive for 9 days.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALTURE-WERBER, E. (1948): Cultivation of Trypanosoma equiperdum in Yolk-Sac of Developing Chick Embryo
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 48, 90-94
2. ALWAR, V.S.; G. RAMANUJACHARI (1953): Observations on the Behaviour and Transmissibility of T.evansi in the infected, hatched out Chick
Ind. Vet. J. 29 (5), 383-387
3. BERGHE VAN DEN, L. (1943): La trypanosomose de poussins éclos après inoculation chorio-allantoidienne
Ann. Soc. belge Méd. trop. 23 (2), 113-139
4. BIENZ, K. (1967): Die Entwicklung von Trypanosomen in verschiedenen Wirten
Path. Microbiol. 30, 867-870
5. CHABAUD, A. (1939): Infection de l'embron de poule par quelques Trypanosomes pathogènes
Bull. Soc. Path. exot. 32, 489-495
6. FAGARD, P.; M. CHARDOME; E. PEEL (1962): Transmission du groupe brucei aux embryons de poulets
Ann. Soc. Méd. trop. 42
7. GANAPATI, P.N. (1948): Cultivation of T.cruzi in Developing Chick Embryo
Nature 162, 963-964
8. GOEBEL, O.M. (1906): Le Nagana chez la Poule
C.R. Soc. Biol. 61, 321-323
9. GOEBEL, O.M. (1908): Le Nagana chez la Poule
Arch. Schiffs Trop. Hyg. 12, 510-525
10. GOEDBLOED, E.; A.J. WILSON (1967): The Infectivity of Trypanosoma rhodesiense in Embryonated Chicken Eggs
Rep. EATRO 12-14

11. GOEDBLOED, E.; H. KINYANJUI (1970): Development of African Pathogenetic Trypanosomes in Chicken Embryos
Exp. Parasit. 27 (3), 464-473
12. HALLAUER, C.; H. KUHN (1940): Über die Dauerzüchtung von Nagana Trypanosomen und Rückfallfieber-spirochäten im bebrüteten Hühnerei
Zeitschr. Hyg. Infektionskr. 122, 406-411
13. HOLBROOK, TH.W.; L.A. STAUBER (1972): Leishmania in the Chick Embryo 1. Multiplication of Amastigotes of L.donovani in the Liver
J. Protozool. 19, 490-493
14. HOOD, M.N. (1949): T.brucei, T.hippicum, T.equiperdum . Infections in Avian Hosts
Ann. J. Trop. Med. 29, 379-387
15. KAWECKI, Z.; J. MORZYCKI (1953): Tests with the Culture of T.equidperdum on Chick Embryo
Bull. St. Inst. Mar. Trop. med. Gdansk, Poland 5, 229-236
16. KÜNZEL, E. (1962): Die Entwicklung des Hühnchens im Ei
Paul Parey Verlag, Berlin
17. LONGLEY, B.J.; N.M. CLAUSEN; A.A. TATUM (1939): Cultivation of Various Species of Trypanosomes in the Developing Chick Embryo
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 41, 365-366
18. MAYR, A.; P.A. BACHMANN; B. BIBRACK; G. WITTMANN (1974):
Virologische Arbeitsmethoden Band I
Seite: (398 - 406) (413 - 414)
Gustav Fischer Verlag Stuttgart

19. MELLO, M.N.; P.M. DEANE (1976): Patterns of development of *Trypanosoma cruzi* in the embryonated chicken egg
Ann. Trop. Med. Parasit. 70 (4), 379-387
20. MESNIL, F.; M. BLANCHARD (1912): Infection des poules dues aux *Trypanosoma rhodesiense* et *Tryp. gambiense*
C.R. Soc. Biol. 72, 938-940
21. MESNIL, F.; M. LEGER; CU. PERARD (1936): Essais divers d'infection des poules par des *Trypanosomes* pathogènes des mammifières
Bull. Soc. Path. Exot. 29, 679-682
22. MESNIL, F.; G. MARTIN (1906): Sur la réceptivité des oiseaux aux *Trypanosomes* pathogènes
C.R. Soc. Biol. 60, 739-741
23. MISRA, K.K.; A. CHOUDHURY (1976): Experimental Infection of *Trypanosoma evansi* in Chicken
J. Protozool. 22, 121
24. MISRA, K.K.; M. GOSH; A. CHOUDHURY (1975): Experimental Transmission of *Trypanosoma evansi* to Chicken
Acta protozool. 15 (3), 381-385
25. MITCHELL, C.A.; R.V.L. WALKER; L.M. HEATH; D.G. McKERCHER (1939): Preliminary Note on the Growth of *T. equiperdum* in the Developing Chick Embryo
Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 3, 223-224
26. NAKABAJASHI, T.; I. MOTOMURA (1966): Studies on the cultivation of *Trypanosoma gambiense* in the developing chick embryo
Endem. Diss. Bull. Nagasaki Univ. 8 (2), 85-91
27. OAG, K.R. (1940): Attempts to cultivate *Trypanosomes* in the Developing Egg
J. Path. Bact. 51, 137

28. OBERLING, C.; N. ANSARI (1951): Culture of *Leishmania tropica* sur la membrane chorio-allantoidienne du poulet
Bull. Soc. Path. Exot. 49, 542-545
29. OTIENO, L.H.; P.G. SARGEAUNT (1971): Morphology of *Trypanosoma brucei* in chick embryos
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 65, 425
30. PIPKIN, A.C. (1960): Avian Embryos and Tissue Culture in the Study of Parasitic Protozoa. II. Protozoa other than *Plasmodium*
Exp. Parasit. 120, 160-167
31. RODHAIN, J.; L. VAN DEN BERGHE (1943): Inoculations de spirochètes et de protozoaires sur membrane chorio-allantoidienne de poulet
Ann. Soc. belge Méd. trop. 23, 112-139
32. SCHILLING, A. (1904): Über die Tsetsekrankheit oder Nagana
Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamte XXI, 476-536

LEBENS LAUF

Am 26. August 1953 wurde ich, Barbara Juliane Gisela Dierig als 2. Kind des Fabrikanten Christian Gottfried Dierig und seiner Ehefrau Marie-Elisabeth, geb. Schrott, in Osnabrück geboren.

In der Spickelschule in Augsburg und in der evangelischen Mädchenschule vor dem Roten Tor absolvierte ich vom September 1959 bis Juli 1963 die Volksschule. Danach wechselte ich in das Anna Barbara von Stettensche Institut in Augsburg, wo ich am 23. Juni 1972 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1972/73 begann ich am Fachbereich Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Studium der Veterinärmedizin. Am 6. Oktober 1977 bestand ich das Staatsexamen. Die Approbation zum Tierarzt erhielt ich am 5. November 1977.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. H.K. Dennig für die Überlassung des Themas und seine jederzeit gewährte Anleitung und Unterstützung bei der Anfertigung meiner Arbeit.

An dieser Stelle möchte ich dem Vorstand des Institutes, Herrn Professor Dr.Dr. h.c. J. Boch, für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Arbeit danken.

Weiterhin danke ich Herrn Wolfgang Högner für seine bereitwillige, kollegiale Hilfe bei allen Problemen.

